

## Contaminación global por nitrógeno y declive de anfibios

ADOLFO MARCO

*Estación Biológica de Doñana,  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas,  
Apartado 1056, E-41080 Sevilla, España. amarco@cica.es*

**Resumen:** En las últimas décadas, muchas especies de anfibios han sufrido un grave declive de sus poblaciones. Se han propuesto diversas causas que actuando solas o en combinación podrían explicar este declive de los anfibios. Por ejemplo, muchas sustancias químicas relacionadas con la agricultura y la industria contaminan hábitats acuáticos, causando severos daños a los ecosistemas. Un caso generalizado de contaminación es la adición artificial de nitrógeno en la naturaleza, fenómeno que ya se considera un nuevo cambio ambiental global de consecuencias imprevisibles. Algunas actividades humanas están doblando la cantidad de nitrógeno que cada año se incorpora a los ciclos biológicos en la Tierra. Las fuentes principales de nitrógeno son los fertilizantes químicos (nitrato amónico y urea), residuos agrícolas y ganaderos (amoniaco y nitrito) y aguas residuales (amoniaco y nitrito). Un exceso de nitrógeno puede provocar problemas serios de salud en humanos y en la fauna (metahemoglobinemia, carcinogénesis, ...). Una revisión detallada de varios estudios realizados con anfibios en diferentes etapas de desarrollo indica que la contaminación global por nitrógeno puede estar contribuyendo decisivamente en la crisis de biodiversidad de este grupo animal. Los contaminantes nitrogenados pueden atravesar la barrera gelatinosa de las puestas y afectar negativamente a los embriones de anfibios. Concentraciones de sustancias nitrogenadas consideradas legales para el consumo humano son nocivas y letales para larvas recién eclosionadas de varias especies. La contaminación en el agua en zonas húmedas con mucha frecuencia sobrepasa esos niveles. Niveles subletales de contaminantes nitrogenados pueden también afectar negativamente la metamorfosis de los anfibios. Por último, los fertilizantes químicos o los residuos ganaderos pueden afectar a anfibios adultos en fase terrestre.

**Palabras clave:** anfibios, conservación, contaminación, declive, fertilizantes, nitrógeno

**Abstract: Global nitrogen pollution and amphibian decline.**- Species losses are occurring at unprecedented rates. As part of this "biodiversity crisis" many amphibian species are exhibiting population declines and range reductions. Many chemical products used in agriculture and industry pollute aquatic habitats, potentially causing severe damage to ecosystems. Specifically, nitrogen pollution is already considered as a new global change with unpredictable consequences. Some human activities are doubling the amount of nitrogen that every year is incorporated to the natural cycles in the Earth. The main sources of nitrogen are chemical fertilizers (ammonium nitrate and urea), residues from crops and cattle raising or wastewater. An excess of nitrogen may cause severe health problems in humans and wildlife (methemoglobinemia, carcinogenesis, ...). This is a review of studies that indicate that nitrogen pollution may be contributing to the decline of amphibian populations. Nitrogen-based pollutants in water negatively affects embryos inside of clutch mass. The recommended levels of nitrate, nitrite and ammonia for drinking water or warm-water fishes are harmful or lethal for newly hatched larvae of several amphibians. Sublethal levels of nitrogen-based pollutants also negatively affect amphibian metamorphosis. The addition of chemical fertilizers to the substrate also affect adult amphibians during their terrestrial life.

**Key words:** amphibians, conservation, decline, fertilisers, nitrogen pollution

### CONTAMINACIÓN GLOBAL POR NITRÓGENO

En general, el incremento artificial de la cantidad de nitrógeno en la naturaleza se considera actualmente como un nuevo cambio ambiental de ámbito global y consecuencias

imprevisibles. Algunas actividades humanas ya han duplicado la cantidad de nitrógeno que cada año se incorpora a los ciclos biológicos de la Tierra y la tasa de adición de nitrógeno artificial sobre la tierra sigue aumentando (VI-TOUSEK *et al.*, 1997). El nitrógeno es un com-

ponente esencial de proteínas, material genético, clorofila y otras moléculas esenciales. En la mayoría de ecosistemas, tanto terrestres como acuáticos, la aportación de nitrógeno es un factor clave que controla la productividad y diversidad vegetales, así como las dinámicas poblaciones de herbívoros y sus depredadores. Además, el nitrógeno es vital en muchos procesos ecológicos y ciclos biogeoquímicos (JARVIS, 1996; TAMM, 1991). Sin embargo, un exceso de nitrógeno puede contaminar el ambiente y provocar serias alteraciones en algunos ecosistemas (ABER, 1992). Las fuentes principales de nitrógeno artificial son los fertilizantes químicos (nitrato amónico y urea), residuos agrícolas y ganaderos (amoníaco y nitrito), vertidos industriales y aguas residuales (amoníaco y nitrito). Estos cuatro tipos de contaminación se producen en todas las zonas habitadas del planeta, de una forma generalizada. Su impacto se puede considerar por tanto global.

Un exceso de nitrógeno provoca la liberación a la atmósfera de gases nitrogenados (óxidos de nitrógeno) que contribuyen al efecto invernadero y a la lluvia ácida. Contribuye a la acidificación del suelo y a la pérdida de otros nutrientes como el calcio y el potasio, esenciales para la fertilidad. Una parte importante del nitrógeno añadido al suelo escapa de los cultivos o las granjas por escorrentía o drenaje y acaba por contaminar tanto las aguas superficiales como las subterráneas (HACK-TENBROEKE *et al.*, 1996; BRANDI-DOHRN *et al.*, 1997), lo que constituye una amenaza para la vida acuática. Estas perturbaciones ambientales acarrear declives poblacionales tanto de plantas como animales y consecuentes pérdidas de biodiversidad (VITOUSEK *et al.*, 1997).

Los hábitats acuáticos son especialmente sensibles a la contaminación por nitrógeno. Pequeños aumentos en la cantidad de nitrógeno presente en el agua pueden provocar la eutrofización y el consiguiente descenso en la cantidad de oxígeno disponible. Paralelamente, también pueden ser responsables del desa-

rrrollo masivo de algas tóxicas y microorganismos patógenos. Estos dos problemas ambientales provocan mortalidades masivas de peces, anfibios y otras especies que forman la fauna acuática de ríos, estuarios y aguas costeras (ROUSE *et al.*, 1999).

Concentraciones más elevadas de sustancias nitrogenadas (por encima de límites recomendados para agua potable, Directiva Europea 98/83/CE ) en el agua pueden ser directamente tóxicas para muchos organismos. Las concentraciones de nitrato y amoníaco, tanto en el agua de humedales como de acuíferos subterráneos, superan con mucha frecuencia valores tóxicos para vertebrados acuáticos. La cantidad de nitratos en el agua puede llegar a ser varias veces más alta en situaciones concretas y durante breves periodos de tiempo, por ejemplo, después de una intensa fertilización de cultivos con abonos inorgánicos (SCHOLEFIELD *et al.*, 1996).

Los casos más severos de contaminación del agua por nitratos pueden causar serios problemas de salud en diferentes grupos de vertebrados, incluidos los seres humanos (EDDY & WILLIAMS, 1994). La metahemoglobinemia, que afecta especialmente a los bebés, y la carcinogénesis por nitrosaminas son sólo dos ejemplos de los efectos negativos del nitrito descritos en vertebrados, incluidos los humanos (U. S. E. P. A., 1986; O. E. C. D., 1986). La toxicidad directa del nitrato es pequeña, pero puede crear problemas serios de salud cuando se reduce hasta nitrito. Habitualmente, los niveles de nitrito en el medio acuático son bajos, pero en ciertas condiciones y en áreas concretas –caso de las orillas con altos contenidos en materia orgánica– pueden alcanzar valores tóxicos superiores a un miligramo por litro (MCCOY, 1972). El nitrato también puede ser reducido en el tracto gastrointestinal de los animales, especialmente en los juveniles, desde donde pasa a la sangre y altera la hemoglobina. Se forma así metahemoglobina, que pierde su capacidad de transportar oxígeno y causa asfixia de los tejidos (metahemoglobi-

nemia), síndrome que puede ser mortal (DAPPEN, 1982). Los nitratos también pueden dar lugar a nitrosaminas, sustancias que tienen efectos cancerígenos a medio plazo. El amoníaco, especialmente en su forma desionizada ( $\text{NH}_3$ ), es también muy tóxico para la mayoría de las especies animales. La mayoría de las membranas biológicas son muy permeables al amoníaco, que penetra en el interior de tejidos, causando la intoxicación directa (DEJOURS *et al.*, 1989a).

La toxicidad de estos contaminantes tan comunes podría estar contribuyendo a la crisis de biodiversidad actual del planeta.

### DECLIVE DE ANFIBIOS

El incremento reciente de la tasa de extinción de vertebrados en una escala temporal ecológica está muy bien documentado (WAKE, 1991; WILSON, 1992; EHRlich *et al.*, 1996). Dentro de esta crisis global de biodiversidad, merecen una atención especial los anfibios. En las últimas décadas, muchas especies de anfibios han sufrido un grave declive de sus poblaciones, una reducción drástica de su área de distribución e incluso, en algunos casos, se han extinguido (BARINAGA, 1990; BLAUSTEIN *et al.*, 1994c; BLAUSTEIN & WAKE, 1990, 1995; REASER, 1996; WAKE, 1991). Los anfibios son especialmente sensibles a extinciones locales por su incapacidad de recolonización debido a restricciones fisiológicas, la relativamente baja movilidad y la filopatría de este grupo (DUELLMAN & TRUEB, 1994; STEBBINS & COHEN, 1995).

Algunos autores consideran que fluctuaciones naturales severas podrían estar siendo consideradas como declives causados por impactos humanos (PECHMAN *et al.*, 1991; GREEN, 1997). Aunque este riesgo es claro, en los últimos años, estudios que muestran evidencias de extinciones y declives poblacionales reales de especies de anfibios se suceden continuamente (WAKE, 1998; LIPS, 1999; DALTON, 2000). Un análisis reciente y exhaus-

tivo sobre estudios demográficos realizados en 936 poblaciones de anfibios a nivel mundial no ofrece duda sobre el rápido declive que han padecido estos vertebrados, en las 5 últimas décadas (HOULAHAN *et al.*, 2000).

Se han propuesto varias causas que actuando por separado o conjuntamente podrían contribuir al declive de los anfibios (CORN, 2001). Merecen destacarse los cambios climáticos (POUNDS & CRUMP, 1994), la fragmentación o la destrucción de sus hábitats (KOLOZSVARY & SWIHART, 1999; KNUTSON *et al.*, 1999), el aumento de la radiación UV (BLAUSTEIN *et al.*, 1994a, 1994b, 2001; LIZANA & PEDRAZA, 1998), la introducción de especies exóticas (KIESECKER & BLAUSTEIN, 1997; HAYES & JENNINGS, 1986; KNAPP & MATTHEWS, 2000), la lluvia ácida (CORN & VERTUCCI, 1992; ROWE & FREDÁ, 2001) o algunas infecciones (BLAUSTEIN *et al.*, 1994b; DASZAK *et al.*, 2000; CAREY, 2000; BOSCH *et al.*, 2001; CRAWSHAW, 2001). Además, parece indudable el impacto de la contaminación ambiental en el declive de las poblaciones de anfibios (BERGER, 1989; HALL & HENRY, 1992; SPARLING *et al.*, 2001).

### EFEECTO DE LA CONTAMINACIÓN SOBRE ANFIBIOS

En el campo se liberan muchas sustancias químicas relacionadas con actividades agrícolas, industriales o urbanas, que acaban incorporándose a los ciclos biológicos. Algunas de estas sustancias pueden ser liberadas en concentraciones suficientemente altas como para provocar daños para la fauna (O. E. C. D., 1986; U. S. E. P. A., 1986). Muchos de los hábitats acuáticos, cruciales para la reproducción y la supervivencia de los anfibios, son receptores de diversos tipos de contaminación. Como consecuencia de la alteración de la calidad ambiental de estos ecosistemas, se ha encontrado en algunas zonas una relación negativa entre la actividad agrícola convencional y la diversidad y salud de anfibios (BERGER, 1989; BISHOP *et al.*, 1999).

El uso de insecticidas, fungicidas, herbicidas y fertilizantes tanto en cultivos herbáceos como leñosos, así como la acidificación o salinización del suelo como consecuencias de esas actividades, supone un riesgo importante para la supervivencia de anfibios (BERRILL *et al.*, 1994; DEVILLERS & EXBRAYAT, 1992; FRISBIE & WYMAN, 1991; COWMAN & MAZANTI, 2001). El impacto puede ser directo sobre individuos adultos en vida terrestre, tras la aplicación de las sustancias químicas en el campo, en forma sólida, líquida o gaseosa. Alteraciones como la lluvia ácida o la contaminación atmosférica provocada por actividades industriales y urbanas o la combustión de derivados del petróleo también pueden tener un impacto sobre anfibios en fase terrestre (ROWE & FREDA, 2001).

Por otro lado, la contaminación de cursos de agua o zonas húmedas afecta a fases acuáticas de anfibios adultos, así como a etapas embrionarias y larvarias. En muchos casos, zonas agrícolas y ganaderas drenan sustancias tóxicas en zonas húmedas. Tras la aplicación de sustancias químicas en los cultivos, estas pueden ser arrastradas por escorrentía hacia cuerpos de agua próximos contaminándolos. La incorporación de contaminantes al agua se puede dar también cuando la aplicación del contaminante se hace en forma de aerosol. El impacto en zonas húmedas suele ser mayor cuando se usan métodos aéreos de aplicación o se hace en condiciones de fuerte viento. En ambos casos se favorece la dispersión de las sustancias químicas a zonas adyacentes a los cultivos. Adicionalmente, áreas industriales y cascos urbanos, vierten aguas residuales cargadas de contaminantes en zonas húmedas o cursos de agua. En el mejor de los casos, estos vertidos han sido previamente tratados, pero casi nunca se eliminan en su totalidad determinados contaminantes.

Se ha comprobado la sensibilidad de anfibios a diferentes tipos de sustancias químicas, como pesticidas (HALL & HENRY, 1992; BERRILL *et al.*, 1994; COWMAN & MAZANTI,

2001), herbicidas (ANDERSON & PRAHLAD, 1976; COOKE, 1977; MANN & BIDWELL, 1999), fertilizantes químicos (HECNAR, 1995; OLDHAM *et al.*, 1997; MARCO *et al.*, 1999), organoclorados (DEVILLERS & EXBRAYAT, 1992; SPARLING *et al.*, 2001), metales pesados (FREDA, 1991; LEFCORT *et al.*, 1998; HORNE & DUNSON, 1995; LINDER & GRILLITSCH, 2001), disruptores hormonales (PICKFORD & MORRIS, 1999; HAYES, 2001) o derivados del petróleo (LEFCORT *et al.*, 1997; DE ZWART & SLOOFF, 1987).

Existen numerosos estudios que analizan los efectos y la relación dosis-efecto de diversas sustancias químicas en diferentes especies de anfibios (rev: DEVILLERS & EXBRAYAT, 1992; ENVIRONMENT CANADA, 2000). Cuando los anfibios son expuestos a contaminantes pueden morir o sufrir diferentes efectos subletales como alteraciones conductuales o de desarrollo, alteraciones de la pigmentación e incluso deformidades (BANTLE *et al.*, 1991; DEVILLERS & EXBRAYAT, 1992; OUELLET, 2001). En muchos casos, se produce la acumulación de sustancias químicas en diversos órganos o tejidos y se producen alteraciones funcionales o fisiológicas que pueden provocar daños en los individuos (CANTON & SLOOFF, 1982; HALL, 1990; HALL & KOLBE, 1980; NEBEKER *et al.*, 1995). Muchos anfibios son componentes cuantitativamente importantes en ecosistemas de agua dulce, y por tanto, la presencia de sustancias tóxicas en anfibios puede provocar a medio plazo la acumulación y bioconcentración de los contaminantes en sus depredadores (FLEMING *et al.*, 1982).

La sensibilidad a contaminantes suele variar entre especies. Hay que tener prudencia a la hora de extrapolar resultados de sensibilidad de una especie concreta al género o grupo filogenético al que pertenece, pues el comportamiento de especies similares de anfibios u otros grupos animales ante determinados contaminantes puede ser muy diferente (MARCO *et al.*, 1999). En muchos casos, se seleccionan

como especies diana para ensayos toxicológicos, animales muy abundantes o con distribuciones muy amplias. No hay que olvidar que una de las posibles razones de su éxito podría ser una elevada tolerancia a la contaminación. La realización de estudios ecotoxicológicos con especies amenazadas debe controlarse y reducirse al máximo, pero en muchos casos, puede ser la única vía para evaluar y corregir las posibles causas del declive de esa especie. Hay que asumir la gran variabilidad que hay entre especies y, por lo tanto, la dificultad de establecer umbrales críticos generales de tolerancia para determinadas sustancias.

En algunos estudios se observan diferencias substanciales durante la ontogenia de los anfibios en la sensibilidad a contaminantes. Las etapas embrionaria y larvaria de la mayoría de los anfibios viven exclusivamente en el medio acuático, por lo que no pueden eludir el contacto directo con los contaminantes presentes en el agua, y son susceptibles de ingerir o absorber por la piel muchos productos tóxicos. Además, la etapa larvaria suele ser mucho más sensible que los embriones a la contaminación del agua (BERRILL *et al.*, 1994; MARCO, observaciones personales). La matriz gelatinosa que envuelve los huevos de la mayoría de los anfibios, además de proteger a los embriones frente a diferentes riesgos naturales (WALDMAN & RYAN, 1983; WARD & SEXTON, 1981; MARCO & BLAUSTEIN, 1998), podría estar evitando la entrada de contaminantes dentro de la membrana perivitelina. Hay evidencias de la alta sensibilidad de larvas de anfibios a multitud de sustancias químicas que contaminan hábitats acuáticos, así como a alteraciones de la calidad del agua como la acidificación o eutrofización (FREDA, 1986; PIERCE, 1985).

A pesar de las innumerables evidencias del impacto de la contaminación ambiental en los anfibios, todavía existen muchas preguntas sin contestar. Es importante avanzar en el diseño y la realización de estudios ecotoxicológicos rigurosos (A. P. H. A., 1980; GAD & WEIL, 1986; STEPHEN, 1975) que nos ayuden a com-

prender el impacto de la contaminación en los anfibios y su declive. Para ello, es importante utilizar instrumentos y metodologías adecuadas que nos permitan, mediante estudios empíricos y aproximaciones experimentales, establecer adecuadamente relaciones de causalidad entre la presencia de contaminantes y la dinámica poblacional de los anfibios, así como para definir criterios de calidad ambiental que garanticen la supervivencia de estos vertebrados.

#### EFECTO DE CONTAMINACIÓN POR NITRÓGENO EN ANFIBIOS

Como ya se ha mencionado, la contaminación por nitrógeno es un fenómeno grave y de carácter global. Sin embargo, y paradójicamente, el conocimiento del impacto de la contaminación por nitrógeno en anfibios es muy limitado. Escasos y recientes estudios muestran que el incremento en la concentración de fertilizantes químicos, residuos ganaderos y otras fuentes de contaminantes derivados del nitrógeno, tanto en medios terrestres como en el agua, puede causar daños en vertebrados acuáticos (RUSSO & THURSTON, 1977; BOGARDI *et al.*, 1991; LEWIS & MORRIS, 1986; O. E. C. D., 1986; OLDHAM & HILTON-BROWN, 1992; WILLIAMS & EDDY, 1989; WATT & OLDHAM, 1995).

Muchos anfibios se reproducen en zonas susceptibles de ser fertilizadas o recibir fertilizantes por escorrentía superficial desde parcelas agrícolas (HALLIDAY, 2000). La asociación entre contaminación por fertilizantes químicos y el declive de anfibios fue apuntada inicialmente por BERGER (1989). Desde entonces varios estudios han confirmado en Europa y Norteamérica que un exceso de fertilizantes químicos en el agua puede estar contribuyendo decisivamente en el declive de varias especies de anfibios (BAKER & WAIGHTS, 1993, 1994; HECNAR, 1995; OLDHAM *et al.*, 1997; MARCO *et al.*, 1999). Las sustancias nitrogenadas más comunes en fertilizantes químicos



son nitratos, nitritos, amoníaco y urea. El exceso de amoníaco y nitritos procedente de residuos ganaderos o aguas fecales también es un problema ambiental serio que ha sido relacionado con el declive de anfibios (WRIGHT & WRIGHT, 1996; DEJOURS *et al.*, 1989a, 1989b). La contaminación por sustancias nitrogenadas puede estar contribuyendo al declive de especies en zonas con un alto grado de humanización o industrialización, o con actividades agrícolas, ganaderas o forestales intensivas.

### A. Efectos en embriones

Los embriones de algunas especies de rana son muy sensibles al amoníaco tanto cuando actúa de forma aislada, como cuando se encuentra formando parte de fertilizantes químicos (BOYER & GRUE, 1995; SCHUYTEMA & NEBEKER, 1999). Estos estudios indican que el amoníaco podría ser más tóxico que el nitrato para los embriones. La gelatina o las membranas del huevo podrían ser más permeables al amoníaco. Sin embargo, los embriones cuando están protegidos por sus membranas y matrices gelatinosas suelen ser más resistentes al amoníaco que las larvas tras la emergencia de la puesta (SCHUYTEMA & NEBEKER, 1999). La gelatina de las puestas de muchas especies de anfibios, además de aportar diferentes tipos de beneficios para los embriones (MARCO & BLAUSTEIN, 1998, 2000; MARCO, 2001), podrían estar protegiéndolos parcialmente del efecto nocivo de contaminantes.

### B. Efectos en larvas

La presencia de nitritos y nitratos en el agua, produce en larvas de anfibios un descenso e inhibición en el consumo de alimento (WATT & OLDHAM, 1995). Además las larvas nadan con dificultades, muestran falta de equilibrio y parálisis, sufren anomalías y edemas y eventualmente mueren (BAKER & WAIGHTS, 1993, 1994; MARCO *et al.*, 1999). Estos efectos se incrementan con la concentración de la sustancia contaminante y con el tiempo.

Se han detectado además, diferencias significativas en sensibilidad entre especies y entre individuos. Hay especies en las que todos los individuos muestran una tolerancia similar al nitrato y por tanto cuando se supera un determinado umbral de concentración, todos los individuos sufren el efecto o mueren. Estas especies podrían desaparecer si la zona en la que habitan registra con frecuencia niveles de concentración próximos o por encima del umbral de tolerancia. Sin embargo, hay especies que muestran variabilidad entre individuos, de forma que algunos individuos son sensibles a concentraciones bajas del contaminante o a exposiciones agudas, mientras que otros ejemplares son muy resistentes, bien a concentraciones más altas o a exposiciones más prolongadas. Como un ejemplo de este modelo, se puede indicar la sensibilidad a nitrito de dos especies de anfibios de Norteamérica (MARCO *et al.*, 1999). En el primer supuesto, de elevada sensibilidad pero escasa variabilidad en la sensibilidad entre individuos se encontraría la rana moteada de Oregón (*Rana pretiosa*), mientras que la salamandra noroccidental (*Ambystoma gracile*) mostraría una alta variabilidad entre individuos en la sensibilidad a nitritos. La primera especie ha desaparecido de amplias zonas agrícolas (el 90 % de su rango de distribución hace 40 años), mientras que la segunda especie sobrevive en zonas con una actividad agrícola intensiva (NUSSBAUM *et al.*, 1983; LEONARD *et al.*, 1993).

Por otra parte, se ha considerado que la introducción de la rana toro (*Rana catesbeiana*) podría haber contribuido igualmente al declive de la rana moteada y de otros anfibios debido a la competencia por el alimento y el hábitat (KIESECKER & BLAUSTEIN, 1997). Paradójicamente, algunos investigadores han descubierto que las larvas de rana toro son bastante tolerantes al nitrito (HUEY & BEITINGER, 1980a y b). La menor sensibilidad de la rana toro al nitrito podría contribuir al éxito de esta especie foránea, procedente del este de Estados Unidos, frente a los anfibios autóctonos.

nos noroccidentales, especialmente en zonas dedicadas a la agricultura intensiva. Recientemente se ha detectado la presencia de esta especie invasora en hábitats acuáticos españoles.

Estos resultados también ponen de manifiesto que los criterios de calidad de agua para consumo humano no garantizan la supervivencia de algunos anfibios protegidos y en peligro de extinción. Y, por descontado, los límites de nitratos recomendados para la vida acuática están muy lejos de proteger a dichas especies. Los límites recomendados de nitratos para aguas ciprinícolas son casi cuatro veces más altos que la concentración a la que se encontró un 50% de mortalidad en larvas de rana moteada después de quince días de exposición a este contaminante y dos veces más altos en el caso de la salamandra noroccidental (MARCO *et al.*, 1999). Resultados similares se han obtenido para el nitrito. Se considera importante establecer criterios de calidad del agua específicos para los anfibios (BOYER & GRUE, 1995).

### C. Efectos en la metamorfosis

La sensibilidad al nitrito decrece con la edad de las larvas de anfibios, al igual que ocurre en humanos u otros grupos animales (MARCO, in prep.). Sin embargo, niveles subletales de contaminantes nitrogenados pueden también afectar negativamente la metamorfosis de los anfibios. La metamorfosis es un período de una drástica y extensiva reorganización morfológica (WERNER, 1986; DUELLMAN & TRUEB, 1994). Durante este proceso, las larvas experimentan una reducción de sus habilidades locomotoras y son más vulnerables a la depredación (WASSERSUG & SPERRY, 1977; BRODIE & FORMANOWICZ, 1983; DEVITO *et al.*, 1998).

La exposición a concentraciones bajas de fertilizantes durante la metamorfosis provoca alteraciones conductuales y morfológicas, modifica el uso del hábitat en las larvas y, además, las larvas emergen a la vida terrestre en etapas poco avanzadas de metamorfosis (MAR-

CO & BLAUSTEIN, 1999). Al no estar totalmente adaptados a la vida terrestre, estos individuos podrían ser mucho más sensibles a la depredación o el ataque de parásitos o patógenos.

### D. Efectos en adultos

La adición de fertilizantes químicos en el terreno también puede afectar a anfibios adultos en fase terrestre. La fertilización de zonas agrícolas con sustancias químicas es una práctica muy extendida. Además, en determinadas zonas, la fertilización de bosques para la mejora de la producción de madera o praderas de todo tipo, para la mejora de la producción de hierba para el ganado o para especies cinegéticas son prácticas extendidas. Estas actividades pueden tener un impacto directo agudo sobre los anfibios que pueblan estas zonas. Se ha comprobado que inmediatamente tras la fertilización de campos agrícolas con nitrato amónico, la rana común (*Rana temporaria*) que atraviesa esos campos puede sufrir intoxicación OLDHAM *et al.*, 1997). Al tratarse de un fertilizante muy soluble, el riesgo para individuos adultos en fase terrestre duraría pocas horas tras la fertilización, dependiendo de la humedad y la precipitación. El empleo de urea como fertilizante en bosques también puede tener un impacto serio en anfibios que habiten ecosistemas forestales. La urea es un fertilizante de liberación más lenta y por tanto puede permanecer más tiempo sobre el sustrato. Este fertilizante tiene un efecto tóxico muy agudo para salamandras terrestres (MARCO *et al.*, 2001). La sensibilidad es mayor cuanto menor es el grado de desarrollo pulmonar y mayor la importancia de la respiración cutánea. Los fertilizantes químicos en anfibios terrestres podrían provocar un stress osmótico o bien tener un efecto tóxico directo provocado por el amoniaco. El uso indiscriminado de fertilizantes químicos en bosques o praderas en zonas húmedas o de montaña podría causar la mortalidad masiva de salamandras terrestres y otros anfibios.

### LOS ANFIBIOS COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN POR NITRÓGENO

Los anfibios son excelentes bioindicadores de la salud de nuestro planeta, debido a su extraordinaria permeabilidad cutánea y a su estrecha relación con hábitats de agua dulce. El seguimiento de poblaciones de anfibios (tanto larvas como adultos) en ecosistemas acuáticos puede ser muy útil para vigilar la presencia de sustancias contaminantes en el agua. En concreto, existe una relación entre la contaminación de charcas y humedales por compuestos nitrogenados y sus efectos sobre las larvas de los anfibios. Adicionalmente y como ya se ha mencionado anteriormente, los anfibios suelen ser sensibles a concentraciones relativamente bajas de contaminantes.

Por otra parte, los anfibios y especialmente las larvas, presentan muchas ventajas para su uso como bioindicadores (COOKE, 1981). Suelen ser muy abundantes y son muy representativos de la vida dulceacuícola, apareciendo en casi todos los ambientes acuáticos. Además, durante su vida, sufren drásticos cambios fisiológicos y morfológicos que ofrecen muy buenas oportunidades para estudiar la interferencia de contaminantes en tales procesos. Además, los anfibios son muy susceptibles de sufrir malformaciones debido a la contaminación del agua tanto durante su desarrollo embrionario (A.S.T.M., 1991; BANTLE *et al.*, 1991) como en etapas larvaria y adulta (DEVILLERS & EXBRAYAT, 1992).

#### *Agradecimientos*

Mi agradecimiento por su ayuda a Chelo Quilchano, Andrew Blaustein, Lisa Belden, Dave Cash, Carmen Díaz Paniagua, Javier Lluch, Miguel Lizana y Valentín Pérez Mellado.

### REFERENCIAS

- ABER, J.D. (1992): Nitrogen cycling and nitrogen saturation in temperate forest ecosystems. *Trends Ecol. Evol.*, 7: 220-223.
- ANDERSON, R.J. & PRAHLAD, K.V. (1976): The deleterious effects of fungicides and herbicides on *Xenopus laevis* embryos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 4: 312-323.
- A.P.H.A. (1980): *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 15th edition. American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- A.S.T.M. (1991): Standard Guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX), pp. 1439-1491, in: *The annual book of ASTM standards*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- BAKER, J. & WAIGHTS, V. (1993): The effect of sodium nitrate on the growth and survival of toad tadpoles (*Bufo bufo*) in the laboratory. *Herpetol. J.*, 3: 147-148.
- BAKER, J. & WAIGHTS, V. (1994): The effects of nitrate on tadpoles of the tree frog (*Litoria caerulea*). *Herpetol. J.*, 4: 106-108.
- BANTLE, J.A., DUMONT, J.N., FINCH, R.A. & LINDER, G. (1991): *Atlas of abnormalities. A guide for the performance of FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus)*. U.S. Army Medical Research and Development Command, Washington, D.C. 68 pp.
- BARINAGA, M. (1990): "Where have all the frogies gone?" *Science*, 247: 1033-1034.
- BERGER, L. (1989): Disappearance of amphibian larvae in the agricultural landscape. *Ecol. Intl. Bull.*, 17: 65-73.
- BERRILL, M., BERTRAM, S., MCGILLIVRAY, L., KOLOHON, M. & PAULI, B. (1994): Effects of low concentrations of forest-use pesticides on frog embryos and tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 657-664.
- BISHOP, C.A., MAHONY, N.A., STRUGER, J., NG, P. & PETTIT, K.E. (1999): Anuran development, density and diversity in relation to



- agricultural activity in the Holland River Watershed, Ontario, Canada (1990-1992). *Environ. Monitor. Assesm.* 57: 21-43.
- BLAUSTEIN, A.R., BELDEN, L.K., HATCH, A.C., KATS, L.B., HOFFMAN, P.D., HAYS, J.B., MARCO, A., CHIVERS, D.P. & KIESECKER, J.M. (2001): Ultraviolet radiation and Amphibians, pp. 63-79, *in*: Cockell C.S. & Blaustein, A.R. (eds.), *Ecosystems, Evolution, and Ultraviolet Radiation*. Springer Verlag, New York.
- BLAUSTEIN, A.R., HOFFMAN, P.D., HOKIT, D.G., KIESECKER, J.M., WALLS, S.C. & HAYS, J.B. (1994a): UV repair and resistance to solar UV-B in amphibians eggs: a link to population declines?. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 1791-1795.
- BLAUSTEIN, A.R., HOKIT, D.G., O'HARA, R.K. & HOLT, R.A. (1994b): Pathogenic fungus contributes to amphibian losses in the Pacific Northwest. *Biol. Conserv.*, 67: 251-254.
- BLAUSTEIN, A.R. & WAKE, D.B. (1990): Declining amphibian populations. A global phenomenon? *Trends Ecol. Evol.*, 5: 203-204.
- BLAUSTEIN, A.R. & WAKE, D.B. (1995): The problem of declining amphibian populations. *Sci. Am.*, 272: 52-57.
- BLAUSTEIN, A.R., WAKE, D.B. & SOUSA, W.P. (1994c): Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conserv. Biol.*, 8: 60-71.
- BOGARDI, I., KUZELKA, R.D. & ENNENGA, W.G. (1991): *Nitrate contamination: exposure, consequence and control*. NATO ASI series G / Ecological Sciences, Vol. 30. Springer-Verlag. Nueva York.
- BOSCH, J. MARTÍNEZ-SOLANO, I. & GARCÍA-PARÍS, M. (2001): Evidence of a Chytrid fungus infection involved in the near disappearance of the common midwife toad in protected areas of Central Spain. *Biol. Conserv.*, 97: 331-337.
- BOYER, R. & GRUE, C.E. (1995): The need for water quality criteria for frogs. *Environ. Health Perspect.*, 103: 352-357.
- BRANDI-DOHRN, F.M., DICK, R.P., HESS, M., KAUFFMAN, S.M., HEMPHILL, D.D.JR. & SELKER, J.S. (1997): Nitrate leaching under a cereal rye cover crop. *J. Environ. Qual.*, 26: 181-188.
- BRODIE, E.D. & FORMANOWICZ, D.R. JR. (1983): Prey size preference of predators: differential vulnerability of larval amphibians. *Herpetologica*, 39: 67-75.
- CANTON, J.H. & SLOOFF, W. (1982): Toxicity and accumulation studies of cadmium (Cd) with freshwater organisms of different trophic levels. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 6: 113-128.
- CAREY, C. (2000): Infectious disease and worldwide declines of amphibian populations, with comments on emerging diseases in coral reef organisms and in humans. *Environ. Health Perspect.*, 108: 1-8.
- COOKE, A.S. (1977): Effects of field applications of the herbicides diquat and dichlobenil on amphibians. *Environ. Pollut.*, 12: 43-50.
- COOKE, A.S. (1981): Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. *Environ. Pollut. Ser. A. Ecol. Biol.*, 25: 123-133.
- CORN, P.S. (2001): Amphibian declines: review of some current hypothesis, pp. 663-696, *in*: SPARLING, D.W., LINDER, G. & BISHOP, C.A. (eds.), *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. SETAC Press, Pensacola, FL.
- CORN, P.S. & VERTUCCI, F.A. (1992): Descriptive risk assesment of the effects of acidic deposition on Rocky mountains amphibians. *J. Herpetol.*, 26: 361-369.
- COWMAN, D.F. & MAZANTI, L.E. (2001): Ecotoxicology of new generation pesticides to amphibians, pp. 233-268, *in*: SPARLING, D.W., LINDER, G. & BISHOP, C.A. (eds.), *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. SETAC Press, Pensacola, FL.
- CRAWSHAW, G.J. (2001): Diseases and pathology of amphibians and reptiles, pp. 199-232, *in*: SPARLING, D.W., LINDER, G. & BISHOP, C.A. (eds.), *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. SETAC Press, Pensacola, FL.

- DALTON, R. (2000): WWW project aims to address worldwide decline in amphibians. *Nature*, 403: 471-472.
- DAPPEN, G.E. (1982): Effects of nitrates upon hemopoietic, lymphoid and vascular tissues of tadpoles and frogs. *Proc. Nebraska Acad. Sci. Affiliat. Soc.*, 92: 23.
- DASZAK, P., CUNNINGHAM, A.A. & HYATT, A.D. (2000): Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science*, 287: 443-449.
- DE ZWART, D. & SLOOFF, W. (1987): Toxicity of mixtures of heavy metals and petrochemicals to *Xenopus laevis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 38: 345-351.
- DEJOURS, P., ARMAND, J. & BEEKENKAMP, H. (1989a): Action de la température et de la taille sur la toxicité de l'ammoniac chez l'amphibien anoure *Xenopus laevis*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 309: 363-368.
- DEJOURS, P., ARMAND, J. & BEEKENKAMP, H. (1989b): La toxicité de l'ammoniac est fonction du pH de l'eau. Etude chez la salamandre *Pleurodeles waltl*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 308: 55-60.
- DEVILLERS, J. & EXBRAYAT, J.M. (1992): *Ecotoxicity of chemicals to amphibians*. Gordon and Breach Science Publishers, Lyon, France. 337 pp.
- DEVITO, J., CHIVERS, D.P., KIESECKER, J.M., MARCO, A., WILDY, E.L. & BLAUSTEIN, A.R. (1998): The effects of snake predation on metamorphosis of Western toads, *Bufo boreas* (Amphibia, Bufonidae). *Ethology* 104: 185-193.
- DUELLMAN, W.E. & TRUEB, L. (1994): *Biology of amphibians*. Baltimore: The John Hopkins University Press.
- EDDY, F.B. & WILLIAMS, E.M. (1994): Freshwater fish and nitrite, pp. 117-143, in: Howells, G. (ed.), *Water quality for freshwater fish*. Gordon and Breach Science Publishers, Yverdon, Switzerland.
- EHRlich, P.R., EHRlich, A.H., & PIMM, S. (1996): Betrayal of Science and Reason. *Nature*, 383: 494.
- ENVIRONMENT CANADA. (2000): The Herptox Page. The effects of environmental contaminants on reptiles and amphibians. Web page: <http://www.on.ec.gc.ca/herptox/intro.html>. Environment Canada.
- FLEMING, W.J., DE CHACIN, H., PATTEE, O.H. & LAMONT, T.G. (1982): Parathion accumulation in cricket frogs and its effect on American kestrels. *J. Toxicol. Environ. Health*, 10: 921-927.
- FREDA, J. (1986): The influence of acidic pond water on amphibians: a review. *Water Air Soil Pollut.*, 30: 439-450.
- FREDA, J. (1991): The effects of aluminum and other metals on amphibians. *Environ. Pollut.*, 71: 305-328.
- FRISBIE, M.P. & WYMAN, R.L. (1991): The effects of soil pH on Sodium Balance in the Red-backed salamander, *Plethodon cinereus*, and three other terrestrial salamanders. *Physiol. Zool.*, 64: 1050-1068.
- GAD, S. & WEIL, C.S. (1986): *Statistics and experimental design for toxicologists*. The Telford Press, Caldwell, NJ, USA.
- GREEN, D. M. (1997): Perspectives on amphibian population declines: defining the problem and searching for answers, pp: 291-308, in: GREEN, D.M. (ed.), *Amphibians in decline: canadian studies of a global problem*. *Herpetological Conservation*, 1.
- HACK-TEN-BROEKE, M.J.D., DE-GROOT, W.J.M. & DIJKSTRA, J.P. (1996): Impact of excreted nitrogen by grazing cattle on nitrate leaching. *Soil Use Manage.*, 12: 190-198.
- HALL, R.J. (1990): Accumulation, metabolism and toxicity of parathion in tadpoles. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 44: 629-635.
- HALL, R.J. & KOLBE, E. (1980): Bioconcentration of organophosphorus pesticides to hazardous levels by amphibians. *J. Toxicol. Environ. Health*, 6: 853-860.
- HALL, R.J. & HENRY, P.F.P. (1992): Assessing the effects of pesticides on amphibians and reptiles: status and needs. *Herpetol. J.*, 2: 65-71.

- HALLIDAY, T. (2000): Nitrates and amphibians. *Froglog*, 38: 3.
- HAYES, M.P. & JENNINGS, M.R. (1986): Decline of ranid frog species in western North America: are bullfrogs (*Rana catesbeiana*) responsible? *J. Herpetol.*, 20: 490-509.
- HAYES, T.B. (2001): Endocrine disruption in amphibians, pp. 573-594, in: SPARLING, D.W., LINDER, G. & BISHOP, C.A. (eds.), *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. SETAC Press, Pensacola, FL.
- HECNAR, S.J. (1995): Acute and chronic toxicity of ammonium nitrate fertilizer to amphibians from southern Ontario. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14: 2131-2137.
- HORNE, M.T. & DUNSON, W.A. (1995): Effects of low pH, metals, and water hardness on larval amphibians. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 29: 500-505.
- HOULAHAN, J.E., FINDLAY, C.S., SCHMIDT, B.R., MEYER, A.H. & KUZMIN, S.L. (2000): Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, 404: 752-755.
- HUEY, D.W. & BEITINGER, T.L. (1980a): Hematological responses of larval *Rana catesbeiana* to sublethal nitrate exposures. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 25: 574-577.
- HUEY, D.W. & BEITINGER, T.L. (1980b): Toxicity of nitrite to larvae of the salamander *Ambystoma texanum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 25: 909-912.
- JARVIS, S.C. (1996): Future trends in nitrogen research. *Plant Soil*, 181: 47-56.
- KIESECKER, J.M. & BLAUSTEIN, A.R. (1997): Population differences in responses of red-legged frogs (*Rana aurora*) to introduced bullfrogs. *Ecology*, 78: 1752-1760.
- KNAPP, R.A. & MATTHEWS, K.R. (2000): Non-native fish introductions and the decline of the Mountain Yellow-legged Frog from within protected areas. *Conserv. Biol.*, 14: 428-438.
- KNUTSON, M.G., SAUER, J.R., OLDESN, D.A., MOSSMAN, M.J., HEMESATH, L.M. & LANNOO, M.J. (1999): Effects of landscape composition and wetland fragmentation on frog and toad abundance and species richness in Iowa and Wisconsin, USA. *Conserv. Biol.*, 13: 1437-1446.
- KOLOZSVARY, M.B. & SWIHART, R.K. (1999): Habitat fragmentation and the distribution of amphibians: patch and landscape correlates in farmland. *Can. J. Zool.*, 77: 1288-1299.
- LEFCORT, H., HANCOCK, K.A., MAUR, K.M. & ROSTAL, D.C. (1997): The effects of used motor oil, silt, and the water mold *Saprolegnia parasitica* on the growth and survival of mole salamanders (genus *Ambystoma*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 32: 383-388.
- LEFCORT, H., MEGUIRE, R.A., WILSON, L.H. & ETTINGER, W.F. (1998): Heavy metals alter the survival, growth, metamorphosis, and antipredatory behavior of columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 35: 447-456.
- LEONARD, W.P., BROWN, H.A., JONES, L.L.C., MCALLISTER, K.R. & STORM, R.M. (1993): *Amphibians of Washington and Oregon*. Seattle Audubon Society, Seattle, Washington. 168 pp.
- LEWIS, W.M. & MORRIS, D.P. (1986): Toxicity of nitrite to fish: a review. *Trans. Am. Fisher Soc.*, 115: 183-194.
- LINDER, G. & GRILLITSCH, B. (2001): Ecotoxicology of metals, pp. 325-408, in: SPARLING, D.W., LINDER, G. & BISHOP, C.A. (eds.), *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. SETAC Press, Pensacola, FL.
- LIPS, K.R. (1999): Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in Western Panama. *Conserv. Biol.*, 13: 117-125.
- LIZANA, M. & PEDRAZA, E.M. (1998): The effects of UV-B radiation on toad mortality in mountainous areas of Central Spain. *Conserv. Biol.*, 12: 703-707.
- MANN, R.M. & BIDWELL, J.R. (1999): The Toxicity of Glyphosate and Several Glyphosate Formulations to Four Species of South-

- western Australian Frogs. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 36: 193-199.
- MARCO, A. (2001): Effects of prolonged terrestrial stranding of aquatic *Ambystoma gracile* egg masses on embryonic development. *J. Herpetol.*, 35: 510-513.
- MARCO, A. & BLAUSTEIN, A.R. (1998): Egg gelatinous matrix protects *Ambystoma gracile* embryos from prolonged exposure to air. *Herpetol. J.*, 8: 207-211.
- MARCO, A. & BLAUSTEIN, A.R. (1999): The effects of nitrite on behavior and metamorphosis in Cascades frogs (*Rana cascadae*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 946-949.
- MARCO, A. & BLAUSTEIN, A. R. (2000): Symbiosis with green algae affects survival and growth of *Ambystoma gracile* embryos. *J. Herpetol.*, 34: 617-621.
- MARCO, A., CASH, D., BELDEN, L. & BLAUSTEIN, A.R. (2001): Sensitivity to urea fertilization in three amphibian species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 40: 406-409.
- MARCO, A., QUILCHANO, C. & BLAUSTEIN, A.R. (1999): Sensitivity to nitrate and nitrite in some pond-breeding amphibians from the Pacific Northwest. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 2836-2839.
- MCCOY E.F. (1972): *Role of bacteria in the nitrogen cycle in lakes*. 16010, EHR 03/72. Environmental Protection Agency, Water Pollution Control Service, Washington, DC, USA.
- NEBEKER, A.V., SCHUYTEMA, G.S. & OTT, S.L. (1995): Effects of cadmium on growth and bioaccumulation in the northwestern salamander *Ambystoma gracile*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 29: 492-499.
- NUSSBAUM R.A., BRODIE, E.D.JR. & STORM, R.M. (1983): *Amphibian and Reptiles of the Pacific Northwest*. University of Idaho Press, Moscow, ID, USA.
- OLDHAM, R.S. & HILTON-BROWN, D. (1992): *Effect of agricultural fertilizers on amphibians (C): NPK granules tested separately*. Contract Report F72-15-05. Nature Conservancy Council, London, UK.
- OLDHAM, R.S., LATHAN, D.M., HILTO-BROWN, D., TOWNS, M., COOKE, A.S. & BURN, A. (1997): The effect of ammonium nitrate fertilizer on frog (*Rana temporaria*) survival. *Agric. Ecosyst. Env.*, 61: 69-74.
- OUELLET, M. (2001): Amphibian deformities: current state of knowledge, pp. 617-646, in: SPARLING, D.W., LINDER, G. & BISHOP, C.A. (eds.), *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. SETAC Press, Pensacola, FL.
- O.E.C.D. (1986): *Water pollution by fertilizers and pesticides*. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Paris.
- PECHMAN, J.H.K., SCOTT, D.E., SEMLITSCH, R.D., CALDWELL, J.P., VITT, L.J. & GIBBONS, J.W. (1991): Declining amphibian populations: the problem of separating human impacts from natural fluctuations. *Science*, 253: 892-895.
- PICKFORD, D.B. & MORRIS, I.D. (1999): Effects of Endocrine-disrupting Contaminants on Amphibian Oogenesis: Methoxychlor Inhibits Progesterone-induced Maturation of *Xenopus laevis* Oocytes in Vitro. *Environ. Health Persp.*, 107: 285-292.
- PIERCE, B.A. (1985): Acid tolerance in amphibians. *BioScience*, 35: 239-243.
- POUNDS, J.A. & CRUMP, M.L. (1994): Amphibian declines and climate disturbances: the case of the golden toad and the Harlequin frog. *Conserv. Biol.*, 8: 75-82.
- REASER, J.K. (1996): The elucidation of amphibian declines: are amphibian populations disappearing? *Amph. Rept. Conserv.*, 1: 4-9.
- ROUSE, J.D., BISHOP, C.A. & STRUGER, J. (1999): Nitrogen pollution: an assessment of its threat to amphibian survival. *Environ. Health Perspect.*, 107: 799-803.
- ROWE, C.L. & FREDI, J. (2001): Effects of acidification on amphibians at multiple levels of biological organization, pp. 545-571, in: SPARLING, D.W., LINDER, G. & BISHOP, C.A. (eds.), *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. SETAC Press, Pensacola, FL.

- RUSSO, R.C. & THURSTON, R.V. (1977): The acute toxicity of nitrite to fishes, in: *Recent advances in fish toxicology*, TUBB, R.A. (ed.). United States Environmental Protection Agency (US EPA). Ecological Research Series, EPA-600/3-77-085. Corvallis, Oregon.
- SCHOLEFIELD, D., LORD, E.I., RODDA, H.J.E. & WEBB, B. (1996): Estimating peak nitrate concentrations from annual nitrate loads. *J. Hydrol.*, 186: 355-373.
- SCHUYTEMA, G.S. & NEBEKER, A.V. (1999): Comparative toxicity of ammonium and nitrate compounds to Pacific treefrog and African clawed frog tadpoles. *Envtl. Toxicol. Chem.*, 18: 2251-2257.
- SPARLING, D.W., LINDER, G. & BISHOP, C.A. (2001): *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. SETAC Press, Pensacola, FL. 877 pp. ???
- STEBBINS, R.C. & COHEN, N.W. (1995): *A natural history of amphibians*. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA.
- STEPHEN, C.E. (1975): *Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians*. EPA-660/3-75-009. U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR, USA.
- TAMM, C.O. (1991): *Nitrogen in terrestrial ecosystems*. Springer Verlag, Berlin. 115 pp.
- U.S. E.P.A. (1986): *Quality criteria for water*. EPA 440/5-86-001. United States Environmental Protection Agency (US EPA). Washington.
- VITOUSEK, P.M., ABER, J., HOWARTH, R.W., LIKENS, G.E., MATSON, P.A., SCHINDLER, D.W., Schlesinger, W.H. & TILMAN, G.D. (1997): Human alteration of the global Nitrogen cycle: causes and consequences. *Issues in Ecology*, 1: 1-16.
- WAKE, D.B. (1991): Declining amphibian populations. *Science* 253: 422-424.
- WAKE, D.B. (1998): Action on amphibians. *Trends Ecol. Evol.*, 13: 379-380.
- WALDMAN, B. & RYAN, M.J. (1983): Thermal advantages of communal egg mass deposition in wood frogs (*Rana sylvatica*). *J. Herpetol.*, 17: 70-72.
- WARD, D. & SEXTON, O.J. (1981): Anti-predator role of salamander egg membranes. *Copeia*, 1981: 724-726.
- WASSERSUG, R.J. & SPERRY, D.G. (1977): The relationship of locomotion to differential predation on *Pseudacris triseriata* (Anura: Hylidae). *Ecology*, 58: 830-839.
- WATT, P.J. & OLDHAM, R.S. (1995): The effect of ammonium nitrate on the feeding and development of larvae of the smooth newt, *Triturus vulgaris* (L.), and on the behaviour of its food source, *Daphnia*. *Freshwater Biol.*, 33: 319-324.
- WERNER, E.E. (1986): Amphibian metamorphosis: growth rate, predation rate and optimal size at metamorphosis. *Am. Nat.*, 128: 319-341.
- WILLIAMS, E.M., & EDDY, F.B. (1989): Effect of nitrite on the embryonic development of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 46:1726-1729.
- WILSON, E.O. (1992): *The diversity of life*. Belknap, Cambridge, MA, USA.
- WRIGHT, P.M. & WRIGHT, P.A. (1996): Nitrogen metabolism and excretion in bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles and adults exposed to elevated environmental ammonia levels. *Physiol. Zool.*, 69: 1057-1078.



